

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 752 842

(21) N° d'enregistrement national : **96 10651**

(51) Int Cl⁶ : C 07 K 14/78. G 01 N 33/532. 33/564. 33/68

(12) **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

(22) Date de dépôt : 30.08.96.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 06.03.98 Bulletin 98/10.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : BIOMERIEUX SA SOCIETE
ANONYME — FR.

(72) Inventeur(s) : SERRE GUY, GIRBAL NEUHAUSER
ELISABETH, VINCENT CHRISTIAN, SIMON MICHEL,
SEBBAG MIREILLE, DALBON PASCAL, JOLIVET
REYNAUD COLETTE, ARNAUD MICHEL et JOLIVET
MICHEL.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : CABINET ORES.

(54) ANTIGENES DERIVES DES FILAGGRINES ET LEUR UTILISATION POUR LE DIAGNOSTIC DE LA
POLYARTHRITE RHUMATOÏDE.

(57) L'invention est relative à un antigène artificiel reconnu
spécifiquement par les auto-anticorps anti-filaggrine pré-
sents dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhu-
matoïde, et constitué par un polypeptide comprenant tout
ou partie de la séquence d'une unité filaggrine ou d'une
molécule apparentée, dans laquelle au moins un résidu ar-
ginine a été substitué par un résidu citrulline. L'invention
est également relative à l'utilisation de cet antigène pour le
diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde.

FR 2 752 842 - A1



ANTIGÈNES DÉRIVÉS DES FILAGGRINES ET LEUR UTILISATION
POUR LE DIAGNOSTIC DE LA POLYARTHRITE RHUMATOÏDE

La présente Invention est relative à de nouvelles préparations d'antigènes spécifiquement reconnus par des auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde.

La polyarthrite rhumatoïde (ci après abrégée en « PR ») est le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques. Il s'agit d'une maladie auto-immune, et le sérum des patients atteints contient des auto-anticorps dont certains sont spécifiques, et peuvent constituer un marqueur de cette maladie, permettant son diagnostic même à des stades précoces. Des recherches ont donc été effectuées en vue d'identifier des antigènes reconnus par ces anticorps, afin d'en obtenir des préparations purifiées utilisables dans des techniques classiques de diagnostic immunologique.

Des auto-anticorps spécifiquement présents chez les malades atteints de PR et réagissant avec un antigène épithélial oesophagien de rat ont été décrits pour la première fois par B. J. J. YOUNG et al. dans Br. Med. J. 2:97-99, (1979). Ces auto-anticorps ont été à l'époque dénommés "anticorps antikératines".

Lors de précédents travaux, l'équipe des Inventeurs a obtenu, à partir d'épithéliums malpighiens humain et murin, des préparations d'antigènes apparentés à la filaggrine et à la profilaggrine, reconnus spécifiquement par les anticorps présents dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, et montré que les « anticorps antikératines » étaient en fait des auto-anticorps anti-filaggrine (ci-après dénommés « AAF »). La Demande EP 0 511 116 décrit ces préparations antigéniques, et leur utilisation pour le diagnostic de la polyarthrite rhumatoïde.

Les filaggrines sont une famille de protéines qui a été identifiée chez diverses espèces, entre autres

chez l'homme, le rat, la souris, le cobaye, au niveau des épithéliums malpighiens kératinisants [pour revue sur les filaggrines, cf. DALE et al. [The Keratinocyte Handbook, Cambridge University Press, pp 323-350, (1994)]] . Elles
5 dérivent de la déphosphorylation et de la protéolyse d'un précurseur, la profilaggrine, qui est constituée essentiellement de domaines répétés de filaggrine séparés par des segments peptidiques interdomaines.

Le gène codant pour la profilaggrine se
10 compose de sous-unités répétées dont chacune code pour une molécule de filaggrine, séparées par des portions codant pour les segments peptidiques interdomaines. Toutes les unités de répétition codant pour chacune des filaggrines humaines ont la même longueur (972 paires de
15 base chez l'homme) ; cependant, chez l'homme, on observe des variations importantes (10-15%) de séquence d'une sous-unité à l'autre. Si la plupart sont conservatives, certaines de ces variations induisent des changements d'acides aminés et dans certains cas des changements de
20 la charge électrique de la protéine. Ainsi les filaggrines humaines forment, indépendamment des modifications post-transcriptionnelles, une population hétérogène de molécules de taille similaire mais de séquences et de charges (pH_i égal à $8,3 \pm 1,1$)
25 différentes [GAN et al., Biochem. 29, p. 9432-9440 (1990)] .

La profilaggrine est une protéine de poids moléculaire élevé (environ 400 000 chez l'homme) soluble en présence de fortes concentrations de sels ou d'urée.
30 Elle possède une forte teneur en acides aminés basiques (arginine et histidine), ainsi qu'en glycine, sérine et acide glutamique. Elle est pauvre en acides aminés non polaires et ne contient ni méthionine, ni cystéine, ni tryptophane. Elle est fortement phosphorylée sur des
35 résidus sérine, ce qui lui confère un point isoélectrique proche de la neutralité.

La profilaggrine est clivée en unités filaggrine au cours d'un processus complexe de maturation, impliquant une déphosphorylation, suivie d'un clivage par des protéases au niveau des segments
5 interdomaines. Ce clivage génère d'abord des fragments de taille intermédiaire, puis les molécules fonctionnelles de filaggrine.

Les filaggrines issues de la déphosphorylation et du clivage de la profilaggrine sont des protéines
10 basiques dont le contenu en acides aminés est similaire à celui des profilaggrines. Elles participent à l'organisation des filaments de kératine, et subissent une maturation progressive au cours de laquelle les résidus arginine, basiques, sont convertis en résidus
15 citrulline, neutres, sous l'action de la peptidylarginine déiminase [HARDING C.R. et SCOTT I.R., J. Mol. Biol. 170, p. 651-673 (1983)]. Ceci entraîne une réduction de leur affinité pour les kératines dont elles se détachent ; elles sont alors totalement dégradées sous l'action de
20 diverses protéases.

Les propriétés des filaggrines et des profilaggrines ont été particulièrement bien étudiées chez le rat, chez la souris et chez l'homme. La taille de la profilaggrine varie, selon les espèces, de 300 à
25 400 kD et celle des filaggrines de 27 à 64 kD.

Le polymorphisme observé chez l'homme entre les séquences des unités filaggrine à l'intérieur d'un même gène de profilaggrine n'apparaît pas chez le rat et la souris. Les filaggrines présentent en outre une grande
30 variabilité inter et intra-spécifique au niveau de leur séquence. Cette variabilité n'affecte toutefois pas leurs propriétés fonctionnelles, ni leur composition globale en acides aminés, et leurs propriétés biochimiques. De même, les localisations tissulaires de la profilaggrine et des
35 filaggrines sont identiques chez les différents mammifères étudiés.

En poursuivant leurs travaux, les Inventeurs ont constaté que la profilaggrine présente dans les granules de kératohyaline de l'épiderme humain n'était contrairement aux filaggrines, pas reconnue par les AAF[SIMON et al. Clin. Exp. Immunol. 100, 90-98 (1995)]. Ils ont alors testé la réactivité des AAF avec de la filaggrine recombinante, et ont constaté que celle-ci non plus n'était pas reconnue. D'autre part, il avait été précédemment observé que les formes des filaggrines épidermiques humaines principalement reconnues par les AAF étaient les formes acido-neutres décrites par SIMON et al. [J. Clin. Invest., 92, 1387, (1993)] et dans la demande EP 0 511 116. Le fait que ces formes acido-neutres correspondent à un stade tardif de maturation de la filaggrine, permettait de supposer que tout ou partie des modifications post-traductionnelles intervenant jusqu'à ce stade étaient impliquées dans la formation des épitopes reconnus par les AAF.

Pour vérifier cette hypothèse, les Inventeurs ont cherché à reproduire *in vitro*, à partir de filaggrine recombinante, ces modifications post-traductionnelles, afin de déterminer lesquelles étaient susceptibles d'influer sur l'antigénicité de la filaggrine.

Ils ont ainsi constaté qu'en fait, la citrullination de la filaggrine suffisait à générer des épitopes reconnus par les AAF. En effet, ils ont observé, en procédant à la déimination *in vitro* de filaggrine recombinante que le remplacement d'au moins une partie des arginines par des citrullines permet l'obtention d'un antigène reconnu spécifiquement par les AAF présents dans le sérum des patients atteints de PR.

La présente Invention a pour objet un antigène artificiel reconnu spécifiquement par les AAF présents dans le sérum des patients atteints de PR, caractérisé en ce qu'il est constitué par un polypeptide recombinant ou de synthèse, comprenant tout ou partie de la séquence

d'une unité filaggrine ou d'une molécule apparentée, dans laquelle au moins un résidu arginine a été substitué par un résidu citrulline.

Au sens de la présente Invention, on entend
5 par : « unité filaggrine », un polypeptide dont la séquence est celle du produit de traduction de l'une quelconque des sous-unités codant pour un domaine filaggrine du gène de la profilaggrine humaine ou d'une autre espèce, ou bien est une séquence consensus,
10 séquence théorique obtenue à partir des séquences des domaines filaggrine.

Au sens de la présente Invention, on entend
par : « molécule apparentée » toute molécule ayant au moins un résidu arginine susceptible d'être transformé en
15 résidu citrulline sous l'action d'une PAD (peptidyl arginine déiminase) ; à titre d'exemple, cette PAD peut être une PAD de muscle de lapin, comme le montrent les exemples ci-après. Il est cependant à la portée de l'homme de l'art de sélectionner toute autre PAD
20 appropriée par de simples essais de routine, en la faisant réagir avec la filaggrine humaine non-citrullinée.

Le terme "peptide" tel qu'utilisé dans la présente Demande signifie notamment protéine ou fragment
25 de protéine, oligopeptide, extrait, séparé ou substantiellement isolé ou synthétisé, notamment ceux obtenus par synthèse chimique ou par expression dans un organisme recombinant ; tout peptide dans la séquence duquel un ou plusieurs acides aminés de la série L sont
30 remplacés par un acide aminé de la série D, et vice-versa ; tout peptide dont l'une au moins des liaisons CO-NH, et avantageusement toutes les liaisons CO-NH de la chaîne peptidique est (sont) remplacée(s) par une (des) liaisons NH-CO ; tout peptide dont l'une au moins des
35 liaisons CO-NH et avantageusement toutes les liaisons CO-NH est ou sont remplacée(s) par une ou des liaison(s) NH-

CO, la chiralité de chaque résidu aminoacyle, qu'il soit impliqué ou non dans une ou plusieurs liaisons CO-NH sus-mentionnées, étant soit conservée, soit inversée par rapport aux résidus aminoacyles constituant un peptide de
5 référence, ces composés étant encore désignés immunorétroïdes, un mimotope, etc.

Des antigènes conformes à l'invention peuvent par exemple être obtenus par action de la PAD sur des protéines ou des peptides naturels, recombinants, ou de
10 synthèse, comportant des résidus arginine ; ils peuvent également être obtenus par synthèse peptidique, en incorporant directement un ou plusieurs résidus citrulline dans le peptide synthétisé.

Selon un mode de réalisation préféré d'un
15 antigène conforme à la présente Invention, il est constitué par un polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence correspondant aux acides aminés 144 à 314 d'une unité filaggrine humaine, dans laquelle au moins un résidu arginine a été substitué par un résidu citrulline,
20 ou bien tout ou partie de la séquence correspondant aux acides aminés 76 à 144 d'une unité filaggrine humaine, dans laquelle au moins un résidu arginine a été substitué par un résidu citrulline.

Un antigène conforme à l'invention peut par
25 exemple être constitué par un peptide comprenant tout ou partie de la séquence correspondant aux acides aminés 71 à 119 d'une unité de filaggrine humaine, dans laquelle au moins un résidu arginine a été substitué par un résidu citrulline.

30 La présente Invention a également pour objet l'utilisation des antigènes conformes à l'invention, tels que définis ci-dessus, pour le diagnostic *in vitro* de la PR.

La présente invention englobe en particulier
35 des compositions antigéniques pour le diagnostic de la présence d'auto-anticorps spécifiques de la PR dans un

échantillon biologique, lesquelles compositions sont caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins un antigène conforme à l'invention, éventuellement marqué et/ou conjugué avec une molécule porteuse.

5 La présente Invention a également pour objet un procédé de détection des auto-anticorps de classe G spécifiques de la PR dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un antigène conforme à l'Invention, tel que défini ci-dessus, dans des conditions permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps avec les auto-anticorps spécifiques de la PR éventuellement présents ;
- la détection, par tous moyens appropriés, du complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

15 Ce procédé de détection peut être mis en oeuvre grâce à un nécessaire comprenant au moins un antigène selon l'Invention, ainsi que des tampons et réactifs appropriés pour la constitution d'un milieu réactionnel permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps, et/ou des moyens de détection dudit complexe antigène/anticorps

Ledit nécessaire peut également comprendre, le cas échéant, des échantillons de référence, tels qu'un ou plusieurs sérum(s) négatif(s) et un ou plusieurs sérum(s) positif(s).

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation et de mise en œuvre d'antigènes conformes à l'invention.

EXEMPLE 1 : REACTIVITE DES SERUMS PROVENANT DE PATIENTS ATTEINTS DE POLYARTHRITE RHUMATOIDE SUR LES FILAGGRINES EPIDERMQUES

On broie à l'aide d'un broyeur de type « potter » électrique un lambeau d'épiderme humain dans un tampon à haute concentration en urée (6M), ce qui

permet de solubiliser l'ensemble des filaggrines épidermiques.

Avec cet extrait épidermique, on réalise une électrophorèse bidimensionnelle (gel 8-25% d'acrylamide, en présence d'urée 6M); la 1ère dimension correspond à une isoélectrofocalisation sur gel dans un gradient de pH allant de 5 à 8 et la seconde dimension correspond à une électrophorèse en conditions dénaturantes, en présence de SDS. Après électrophorèse, les protéines du gel sont transférées sur nitrocellulose.

Les réactions immunologiques sont effectuées selon un protocole classique.

La membrane de nitrocellulose est incubée pendant une nuit à 4°C avec un sérum de patient atteint de PR, dilué au 1/2000, puis les immunoglobulines du sérum qui ont réagi avec les antigènes fixés sur la membrane sont détectées à l'aide d'un anticorps secondaire anti-IgG humaines marqué à la peroxydase. La révélation en présence du substrat de la peroxydase est effectuée par la méthode ECL (Enhanced Chemi-Luminescence, AMERSHAM) selon le protocole préconisé par le fabricant.

Dans un deuxième temps, la même membrane est lavée puis incubée pendant 1 heure et demie à 20°C, en présence cette fois de l'anticorps monoclonal AHF1 décrit par SIMON et al. [J. Invest. Dermatol. 105, 432, (1995)] à une concentration de 0,2 µg/ml, puis d'un anticorps secondaire anti-IgG de souris marqué à la peroxydase. La réaction est révélée par la méthode ECL, comme indiqué ci-dessus.

Les résultats sont illustrés par la figure 1 :

L'anticorps monoclonal AHF1 reconnaît des isoformes de filaggrine dont le pHi s'échelonne de 5,8 à 8,5. En revanche, seules les isoformes dont le pHi s'échelonne de 5,8 à 7,4, sont détectées par le sérum du patient atteint de PR

Le fait que seules les isoformes les plus acides de filaggrines soient détectées, permet de supposer que l'acidification de ces isoformes fait partie des modifications post-traductionnelles qui seraient
5 nécessaires à la reconnaissance de la filaggrine par les anticorps présents dans les sérums des patients atteints de PR.

EXEMPLE 2 : DEIMINATION IN VITRO DE FILAGGRINE RECOMBINANTE PAR LA PEPTIDYL ARGININE DEIMINASE (P.A.D.).

10 De la filaggrine recombinante est produite selon le protocole suivant :

Un fragment d'ADN codant pour une unité filaggrine est amplifié par PCR, à partir d'ADN génomique humain (cellules RAJI : ATCC CCL86) à l'aide des 2
15 amorces suivantes :

Amorce 5' :

5' TTCCTATACCAGGTGAGCACTCAT 3'

Amorce 3' :

5' AGACCCTGAACGTCCAGACCGTCCC 3'

20 Le produit d'amplification est cloné dans le site SmaI du vecteur pUC19. On procède à la sélection des clones recombinants, en vérifiant la présence d'un insert de 972 pb obtenu après digestion avec SacI et XbaI. Cet insert est ensuite sous-cloné dans pUC19. L'insert
25 résultant de ce sous-clonage est ensuite transféré dans le vecteur pGEX (commercialisé par la société PHARMACIA), entre les sites EcoRI et HindIII. Le vecteur d'expression ainsi obtenu exprime, dans *E. coli*, la filaggrine en fusion avec la glutathion-S-transférase (GST), sous
30 contrôle du promoteur procaryote Tac. La synthèse de la protéine recombinante est induite par addition d'isopropyl- β -D-galactoside (IPTG) à la culture.

La filaggrine recombinante ainsi obtenue sera dénommée ci-après : « fil-gst ».

35 On constate après électrophorèse, l'existence de 9 fragments qui résultent d'une protéolyse post-

traductionnelle de la filaggrine entière. Les emplacements des différentes coupures générant ces fragments sont indiqués sur la figure 2.

Le mélange des 9 fragments est soumis à une déimination *in vitro* par la peptidyl arginine déiminase.

On utilise une préparation de peptidyl arginine déiminase de muscle de lapin (681 U/ml) commercialisée par TAKARA BIOMED EUROPE, selon le protocole préconisé par le fabricant.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Milieu réactionnel : Tris-HCl 0,1 M, CaCl_2 10 mM, DTT 5 mM, pH 7,4 ;
- Rapport enzyme/substrat : 140 mU/ μmole de filaggrine contenant 10% d'arginine soit 4 mU/ μmole d'arginine ;
- Incubation : entre 0 et 60 mn à 50°C ;
- Arrêt de la réaction : chauffage 3 mn en tampon de LAEMMLI

On effectue en parallèle les 8 réactions suivantes.

- (1) BSA (sérum albumine bovine) incubée dans milieu réactionnel (1h, 50°C) sans P.A.D.
- (2) BSA incubée dans milieu réactionnel (1h, 50°C) avec 60 mU de P.A.D.
- (3) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (1h, 50°C) sans P.A.D.
- (4) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (5 minutes à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.
- (5) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (15 minutes à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.
- (6) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (30 minutes à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.
- (7) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (1h à 50°C) avec 60 mU de P.A.D.

(8) fil-gst incubée dans milieu réactionnel (1h à 50°C) avec 60 mU de P.A.D. et en présence de 10 mM de N-éthylmaléimide (inhibiteur de la P.A.D.).

On dépose 1 µl de chaque échantillon sur un
5 gel d'électrophorèse (gel PHAST[®]-SDS 12,5%, PHARMACIA), et on réalise l'électrophorèse avec l'appareil PHAST-SYSTEM[®] (PHARMACIA), dans les conditions préconisées par le fabricant. Après transfert sur nitrocellulose, on révèle soit avec un pool de 5 sérums de patients atteints de
10 PR, dilué au 1/2000 (Figure 3a), soit avec l'anticorps monoclonal anti-filaggrine AHF2 [SIMON et al. J. Invest. Dermatol. 105, 432, (1995)] à la concentration de 0,2 µg/ml (Figure 3b).

Le complexe antigène/anticorps est révélé à
15 l'aide d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, par la technique ECL.

Les résultats sont illustrés par la figure 3

- Piste 1 : BSA (1 heure, 50°C)
Piste 2 : BSA + PAD (1 heure, 50°C)
20 Piste 3 : fil-gst (1 heure, 50°C)
Piste 4 : fil-gst + PAD (5 minutes, 50°C)
Piste 5 : fil-gst + PAD (15 minutes, 50°C)
Piste 6 : fil-gst + PAD (30 minutes, 50°C)
Piste 7 : fil-gst + PAD (1 heure, 50°C)
25 Piste 8 : fil-gst + PAD + inhibiteur. (1 heure, 50°C)

En l'absence de réaction de citrullination, la fil-gst n'est pas reconnue par les sérums de patients atteints de PR (Figure 3a, piste 3), alors que dès 5 minutes de citrullination (Figure 3a, piste 4), elle est
30 détectée par ces sérums. On constate une augmentation de la réactivité avec le pool de sérums quand on fait agir la P.A.D. pendant 60 minutes à 50°C (Figure 3a, piste 7).

- les fragments 1, 2, 3 (bandes repérées par des points) de la fil-gst sont fortement reconnus, après
35 citrullination, par les sérums de patients atteints de PR. Les fragments 4 et 5 (bandes repérées par des

astériques) sont également reconnus. Ces résultats permettent de supposer qu'il existe un ou plusieurs épitopes de forte affinité dans la moitié COOH-terminale de la filaggrine (144 à 314), cet épitope étant répété
5 entre les positions 76 et 144.

- l'anticorps monoclonal AHF2 reconnaît tous les fragments de fil-gst, citrullinée ou non.

EXEMPLE 3 : SPECIFICITE DE LA RECONNAISSANCE DE LA FIL-GST CITRULLINEE PAR LES SERUMS

10 Dans une première série d'expériences, (Figure 4a) on compare la réactivité de la fil-gst non citrullinée (fil-gst seule, 30 minutes à 50°C) et de la fil-gst citrullinée par la P.A.D. 30 minutes à 50°C avec des sérums humains composés de :

- 15 - sérums de personnes normales : T(2) et T(3)
- sérums de patients atteints de PR présentant des titres élevés en AAF détectés par immunotransfert sur les variants acido-neutres de la filaggrine humaine, et par immunofluorescence indirecte sur cryocoupes
20 d'oesophage de rat : PR(6) et PR(8).

- anticorps anti-filaggrine purifiés à partir du sérum d'un patient atteint de PR par chromatographie d'affinité, sur une colonne greffée avec les isoformes acido-neutres de la filaggrine humaine : AAF.

25 Un contrôle positif est aussi réalisé avec l'anticorps monoclonal AHF2.

Dans une seconde série d'expériences (Figure 4b), on confirme la réactivité de la fil-gst citrullinée avec une plus large série de sérums :

- 30 - 4 sérums témoins : T(4)
- 4 sérums de patients atteints de PR ne présentant pas d'AAFs détectables en immuno-transfert ou en immunofluorescence indirecte : PR(4)
- 9 sérums de patients atteints de PR avec des
35 titres élevés en AAF (trois d'entre eux (*) ont été aussi testés dans la première série d'expérimentations) : PR(9)

- des anticorps anti-filaggrine purifiés par chromatographie d'affinité, sur une colonne greffée avec les isoformes acido-neutres de la filaggrine, à partir d'un pool de sérums de 40 patients atteints de PR : AAF

5 - les anticorps monoclonaux AHF (1-7).

Les sérums sont utilisés à la dilution de 1/2000 ; les anticorps anti-filaggrine purifiés par chromatographie d'affinité sont utilisés à la concentration de 4 µg/ml ; les anticorps monoclonaux sont
10 utilisés à la concentration de 0,2 µg/ml

Les résultats sont les suivants :

- La citrullination de la filaggrine recombinante est nécessaire pour la reconnaissance par les AAFs des sérums de patients atteints de PR (14 sérums
15 positifs sur 14 la reconnaissent) ;

- les auto-anticorps anti-filaggrine, purifiés par chromatographie d'affinité à partir des sérums de patients atteints de PR, montrent la même réactivité sur fil-gst citrullinée que les sérums de patients atteints
20 de PR (reconnaissance des fragments correspondant aux bandes 1 à 5). Ceci montre que ce sont bien les AAF présents dans ces sérums qui reconnaissent la fil-gst citrullinée.

**EXEMPLE 4 : CITRULLINATION DES PEPTIDES S-47-S ET S-35-R
25 PAR LA P.A.D, ET ESSAI DE LA RÉACTIVITÉ DES PEPTIDES CITRULLINÉS.**

Le peptide de 49 acides aminés S-47-S de séquence (code 1 lettre) :

NH₂-STGHSGSQHSHTTTQGRSDASRGSSGSRSTSRETRDQEQSGDGSRHSGS-COOH
30 correspondant aux acides aminés 71 à 119 de la séquence d'une unité de filaggrine humaine, et comportant 6 résidus arginine, et

le peptide de 37 acides aminés S-35-R de séquence (code 1 lettre) :

35 NH₂-SQDRDSQAQSEDSERRSASASRNHRGSAQEQRDGSR-COOH

correspondant aux acides aminés 155 à 191 de la séquence d'une unité de filaggrine humaine, et comportant 7 résidus arginine, ont été préparés par synthèse peptidique.

5 Ces 2 peptides, ainsi que la fil-gst, ont été citrullinés par action de la P.A.D., pendant 30 minutes à 50°C, dans le même milieu réactionnel que celui indiqué à l'exemple 2. Les conditions spécifiques pour chaque peptide, et pour la fil-gst sont les suivantes :

- 10
- peptide S-47-S : 4 mU/ μ mole arginine
 - peptide S-35-R : 2,7 mU/ μ mole arginine
 - fil-gst : comme indiqué à l'exemple 2.

On compare, par « dot-blot », la réactivité de chaque peptide et celle de la fil-gst, avant et après
15 action de l'enzyme, vis-à-vis de l'anticorps monoclonal AHF4, et du sérum d'un patient atteint de PR.

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- 20
- 0,5 μ g par dépôt de chaque antigène (peptides, fil-gst, variants acido-neutres de la filaggrine (VAF))
 - Traitement de la nitrocellulose 45 minutes à 80°C, avant immunodétection.
 - sérum PR utilisé à la dilution de 1/2000 ;
- 25 anticorps monoclonal AHF4 utilisé à une concentration de 0,2 μ g/ml

Les résultats sont illustrés par la Figure 5, qui montre que :

- 30
- AHF4 reconnaît le peptide S-47-S et la fil-gst citrullinés ou non mais ne reconnaît pas S-35-R, citrulliné ou non.

35

- S-47-S est reconnu, après citrullination, par le sérum du patient atteint de PR, alors que S-35-R, citrulliné ou non, n'est pas reconnu. Le même sérum reconnaît par ailleurs les VAF et la fil-gst citrullinée, mais ne reconnaît pas la fil-gst non-citrullinée.

REVENDEICATIONS

- 1) Antigène artificiel reconnu spécifiquement par les auto-anticorps anti-filaggrine présents dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, caractérisé en ce qu'il est constitué par un polypeptide recombinant ou de synthèse, comprenant tout ou partie de la séquence d'une unité filaggrine ou d'une molécule apparentée, dans laquelle au moins un résidu arginine a été substitué par un résidu citrulline.
- 2) Antigène artificiel selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence correspondant aux acides aminés 144 à 314 d'une unité filaggrine humaine, dans laquelle au moins un résidu arginine a été substitué par un résidu citrulline, ou bien tout ou partie de la séquence correspondant aux acides aminés 76 à 144 d'une unité filaggrine humaine,.
- 3) Antigène artificiel selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué par un peptide comprenant tout ou partie de la séquence correspondant aux acides aminés 71 à 119 d'une unité de filaggrine humaine, dans laquelle au moins un résidu arginine a été substitué par un résidu citrulline.
- 4) Utilisation d'un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 3 pour le diagnostic *in vitro* de la polyarthrite rhumatoïde.
- 5) Composition antigénique pour le diagnostic de la présence d'auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle contient au moins un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 3, éventuellement marqué et/ou conjugué avec une molécule porteuse .
- 6) Procédé de détection des auto-anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en contact dudit échantillon biologique avec au moins un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 3, dans des conditions permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps avec les auto-anticorps
5 spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde éventuellement présents ;
- la détection, par tous moyens appropriés, du complexe antigène/anticorps éventuellement formé.

7) Nécessaire pour la détection des auto-
10 anticorps spécifiques de la polyarthrite rhumatoïde dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un antigène selon une quelconque des revendications 1 à 3, ainsi que des tampons et réactifs appropriés pour la constitution d'un milieu réactionnel
15 permettant la formation d'un complexe antigène/anticorps, et/ou des moyens de détection dudit complexe antigène/anticorps.

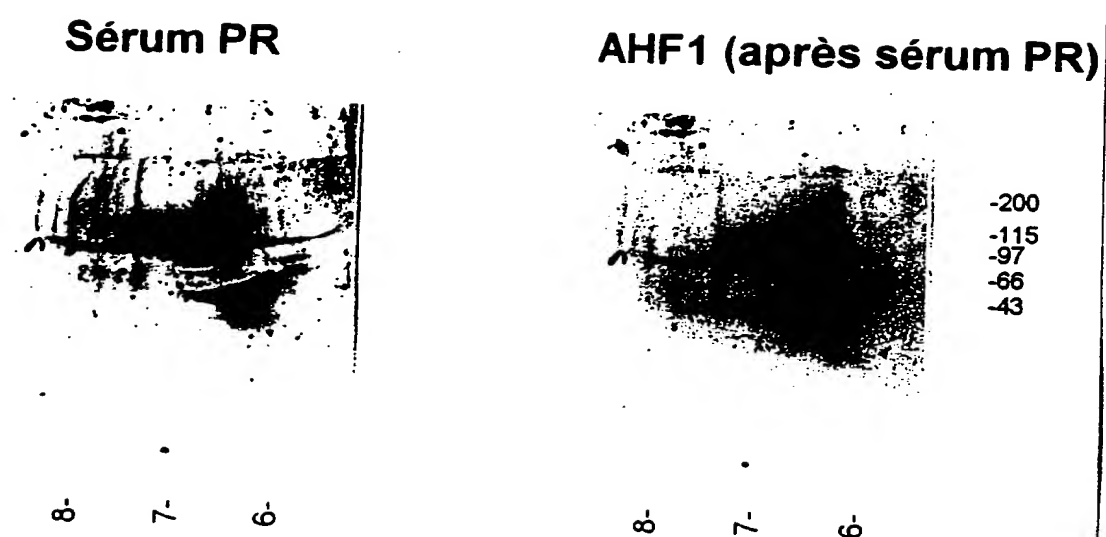


FIG.1

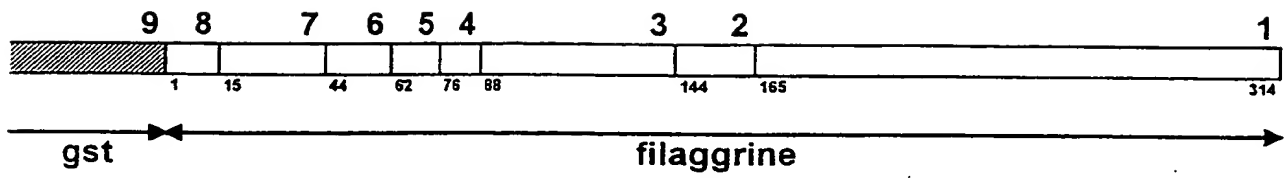


FIG.2

3/5

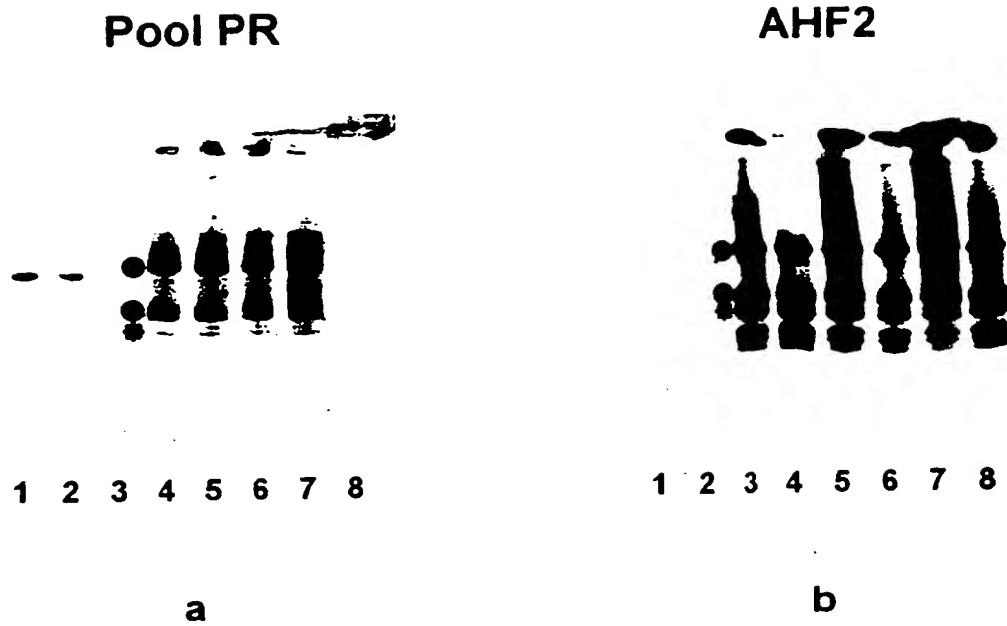


FIG.3

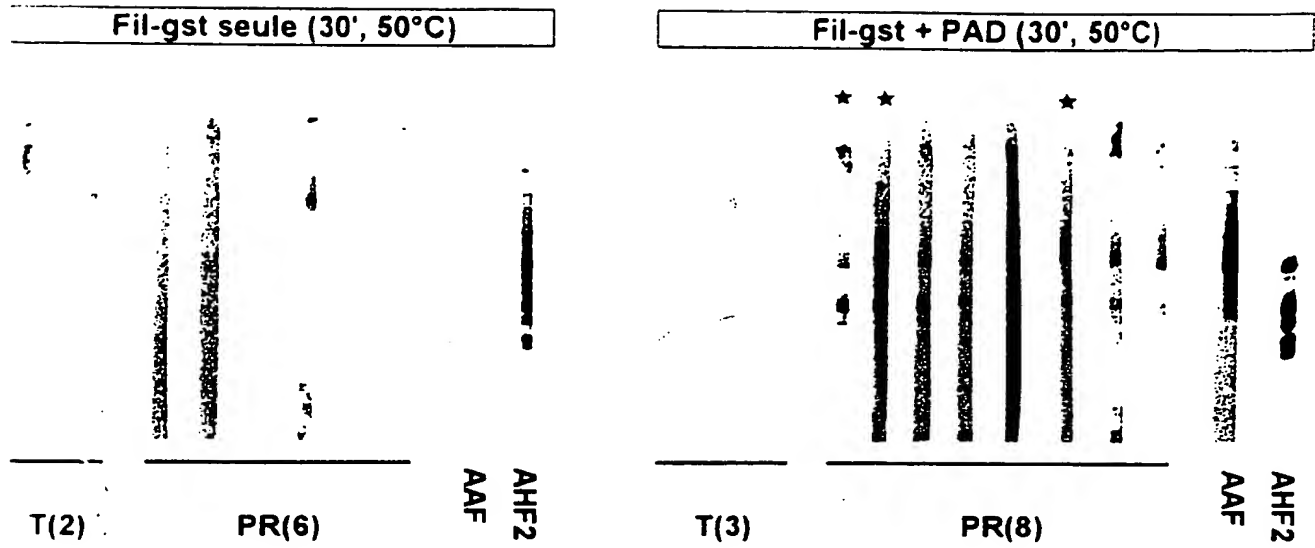
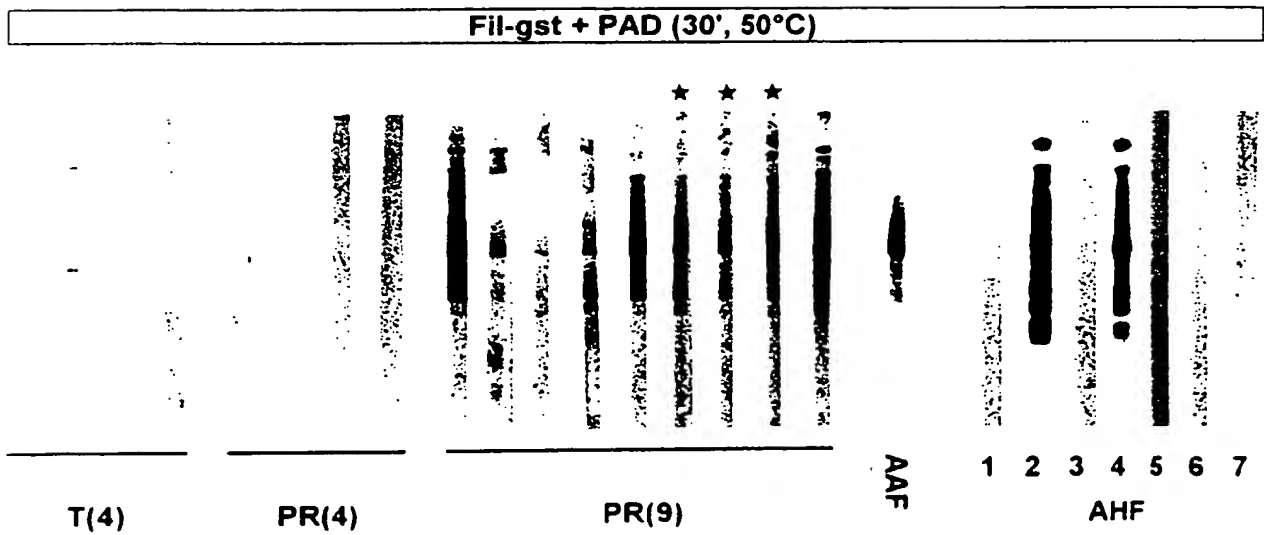
a**b**

FIG.4

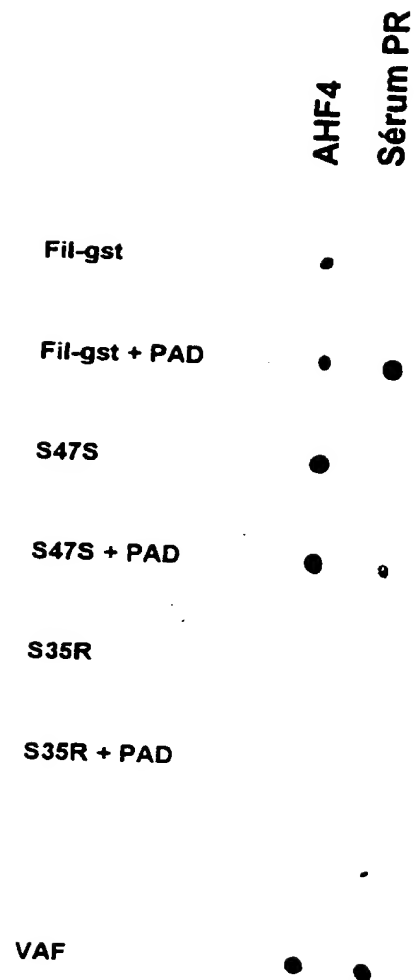


FIG.5

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2752842

N° d'enregistrement
national

FA 534812

FR 9610651

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D,X	WO 92 19649 A (CLONATEC) 12 Novembre 1992 * le document en entier *	1,4-7
A	WO 89 07764 A (HOFFMANN LA ROCHE) 24 Août 1989 * le document en entier *	1-7
D,A	BIOCHEMISTRY, vol. 29, 1990, pages 9432-9440, XP002030710 GAN, S-Q., ET AL. : "ORGANIZATION, STRUCTURE, AND POLYMORPHISMS OF THE HUMAN PROFILAGGRIN GENE" * le document en entier *	1-7
A	THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 105, no. 3, Septembre 1995, pages 432-437, XP000673460 SIMON, M., ET AL. : "MONOCLONAL ANTIBODIES TO HUMAN EPIDERMAL FILAGGRIN, SOME NOT RECOGNIZING PROFILAGGRIN" * le document en entier *	1-7
D,A	THE JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 92, no. 3, 1993, pages 1387-1393, XP000673439 SIMON, M., ET AL. : "THE CYTOKERATIN FILAMENT-AGGREGATING PROTEIN FILAGGRIN IS THE TARGET OF THE SO-CALLED "ANTI-KERATIN ANTIBODIES", AUTOANTIBODIES SPECIFIC FOR RHEUMATOID ARTHRITIS" * le document en entier *	1-7
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K C12N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
13 Mai 1997		Holtorf, S
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		



19

19